

胞二磷胆碱对大鼠局部脑缺血后空间学习和记忆的影响

赵建军, 刘勇, 陈新林, 刘建新, 田英芳, 张蓬勃, 康前雁, 邱芬 (西安交通大学医学院人体解剖与组织胚胎学系神经科学中心, 陕西西安 710061)

摘要:目的 探讨胞二磷胆碱对大鼠局部脑缺血后空间学习和记忆能力的影响。方法 实验分为正常对照组、缺血对照组和胞二磷胆碱组。线栓法制作大鼠大脑中动脉阻塞模型, 术后 2 周内腹腔注射胞二磷胆碱, 第 15 天开始采用 Morris 水迷宫装置评价大鼠的空间学习和记忆能力。结果 脑缺血对照组大鼠在定向航行试验和空间探索试验中均表现出明显的空间认知功能的障碍, 胞二磷胆碱组大鼠平均逃避潜伏期与缺血对照组比较明显缩短 ($P < 0.01$)。在空间探索试验中, 胞二磷胆碱组大鼠原平台象限停留时间百分比以及穿过原平台位置次数均大于脑缺血对照组 ($P < 0.01$)。缺血对照组多采用边缘式和随机式搜索策略; 正常对照组多采用直线式和趋向式搜索策略; 胞二磷胆碱组采用趋向式和随机式搜索策略的频数较多。结论 胞二磷胆碱可以明显改善大鼠永久性局部脑缺血后空间学习和记忆能力。

关键词:胞二磷胆碱; 学习; 记忆; morris 水迷宫; 脑缺血

中图分类号: R338.64; R743.33 文献标识码: A 文章编号: 1673-4254(2006)02-0174-03

Effect of citicoline on spatial learning and memory of rats after focal cerebral ischemia

ZHAO Jian-jun, LIU Yong, CHEN Xin-lin, LIU Jian-xin, TIAN Ying-fang, ZHANG Peng-bo, KANG Qian-yan, QIU Fen

Research Center for Neuroscience, Department of Anatomy, Histology and Embryology, School of Medicine of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of citicoline on spatial learning and memory of rats after focal cerebral ischemia. **Methods** The rats were randomly divided into sham-operation group, ischemia control group and citicoline group. In the later two groups, focal cerebral ischemia model was established by introducing an intraluminal filament into the left middle cerebral artery, and citicoline (500 mg/kg) or 0.9% NaCl was administered intraperitoneally once a day for 2 weeks after the operation. The rats in the sham-operation group were not subjected to middle cerebral artery occlusion (MCAO) with intraluminal filament. The spatial learning and memory functions of the rats were evaluated by Morris water maze test 15 days after MCAO for 5 days. **Results** The rats in ischemia control group exhibited serious spatial learning and memory deficits in both place navigation test and spatial probe test. In the former test, the mean escape latency of citicoline-treated rats were significantly shorter than that of ischemia control rats ($P < 0.01$), and in the latter test significant difference was noted between citicoline and ischemia control groups in the percentage time spent in the former platform quadrant and frequency of crossing the former platform ($P < 0.05$). **Conclusion** Citicoline can improve the spatial learning and memory function of rats after focal cerebral ischemia.

Key words: citicoline; learning; memory; Morris water maze; cerebral ischemia

脑缺血后存活者不仅存在各种运动功能的缺损, 也伴随着较为严重的认知能力的损害及学习和记忆能力的下降。胞二磷胆碱在临床上对急性缺血性脑血管疾病有一定疗效, 但是对于脑缺血引起的脑高级功能障碍是否有作用仍未清楚。本研究利用大鼠大脑中动脉阻塞模型, 用 Morris 水迷宫实验方法研究胞二磷胆碱改善局部脑缺血所致大鼠空间学习和记忆的作用。

收稿日期: 2005-06-28

基金项目: 国家自然科学基金(30300109)

Supported by National Natural Science Foundation of China (30300109)

作者简介: 赵建军(1968-), 男, 副教授, 在读博士研究生, 电话: 029-82655428, E-mail: zhaoj@mailst.xjtu.edu.cn

通讯作者: 刘勇(1955-), 男, 教授, 博士, 博士生导师, 电话: 029-82655080, E-mail: liuy5599@mail.xjtu.edu.cn

1 材料和方法

1.1 采用线栓法制作大鼠局部脑缺血模型

雄性 Spague Dawley 大鼠(西安交通大学动物中心提供), 体质量 250~300 g, 按 40 mg/kg 腹腔内注射戊巴比妥钠(Sigma 公司, USA)麻醉, 仰卧于手术台上, 左侧颈部切口, 分离颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA), 结扎 ECA 近端和结扎 CCA 近端, 动脉夹夹闭 ICA, 在 CCA 近动脉分叉约 0.4 cm 处剪一小口, 将末端烧成球状长 2.5 cm 的 3/0 尼龙线插入 ICA, 线进入长度距离 CCA 分叉处为 (1.75±0.05) cm。维持肛温在 37℃左右, 保持呼吸道通畅。大鼠大脑中动脉阻塞(MCAO)后 2 h, 参照改良的 Bederson's 评分方法进行神经功能缺失评分^[1], 选择评分大于 2 分的动物进行下一步实验。

1.2 动物分组与处理方法

将大鼠分为正常对照组、缺血对照组和胞二磷胆碱组,每组 10 只。正常对照组不进行手术处理;缺血对照组和胞二磷胆碱组经线栓法制作大鼠局部脑缺血模型。胞二磷胆碱组于局部脑缺血后立即腹腔注射 2 ml 胞二磷胆碱注射液 (500 mg/kg),正常对照组和缺血对照组术后腹腔注射等量生理盐水,第 2 天至第 14 天连续给药。

1.3 学习和记忆行为学与神经功能观测

Morris 水迷宫为一不锈钢的圆形水池,直径 130 cm,高 50 cm,水深 30 cm,水温控制在(24±1)℃。池壁标明 4 个入水点,由此将水池等分为 4 个象限,任选其中 1 个象限,正中放置 1 个直径 11 cm、高 29 cm 的平台(该装置自制)。迷宫上方装有摄像头,并和电子计算机连接,自动录入大鼠游泳轨迹进行分析(摄像头及图像采集器,北京隆冠科技有限公司;动物行为分析软件,中国科学院心理所)。训练期间迷宫外参照物保持不变。

测试内容包括:(1)定位航行试验:历时 5 d,每天分上、下午两段,每段训练 4 次。将大鼠面向池壁分别从 4 个入水点放入水中,记录其在 120 s 内寻找到平台的时间(逃避潜伏期)和游泳路径。如果在 120 s 内未找到平台,潜伏期记为 120 s,并由实验者将其牵引至平台上,停留 10 s,再放回笼中。定位航行试验通过对训练大鼠游泳寻找平台,观测其逃避潜伏期长短可检测动物的学习能力。(2)空间探索试验:第 5 天撤除平台,将大鼠从入水点放入水中,记录 120 s 内大鼠在池中的游泳轨迹和时间。以上述指标观察空间学习、记忆力的变化。经过前 4 d 共 8 段的训练学习,学习和记忆正常动物常能记住平台在水迷宫中的空间位置,故在第 9 段时它们能很快寻找到平台。撤除平台后,学习和记忆功能正常的动物会在 120 s 内在原平台所在象限反复寻找平台,而对于学习和记忆功能障碍的动物则会在水迷宫中茫无目的地寻找原平台。

1.4 数据分析及处理

各组大鼠寻找平台逃避潜伏期、原平台象限停留时间百分比以及穿过原平台位置次数均以均数±标准误表示,统计学软件为 SPSS10.0。采用重复测量的单因素方差分析 (post-way RANOVA) 比较组间差异,进一步 post-hoc 分析采用 Tukey 比较两组间差异。各组大鼠寻找平台搜索策略也以均数±标准误表示,采用 Mann-Whitney U 秩检验比较组间差异。平台象限停留时间占总游泳时间的百分比采用 One-way ANOVA 分析。

2 结果

2.1 胞二磷胆碱对大鼠局部脑缺血后定向航行实验中逃避潜伏期的影响

大鼠接受了 5 d 共 9 个时间段训练,第 1~3 时间段潜伏期迅速下降,第 4~6 时间段降势趋缓,第 7~9 时间段潜伏期平稳。与脑缺血对照组相比,正常对照组、胞二磷胆碱组在每一时间段逃避潜伏期均明显缩短 ($P<0.05$);胞二磷胆碱组与脑缺血对照组比较,在每一时间段逃避潜伏期明显缩短 ($P<0.05$);在第 7~9 时间段胞二磷胆碱组逃避潜伏期趋近于正常对照组(图 1)。正常对照组、缺血对照组和胞二磷胆碱组的平均逃避潜伏期(s)分别为 23.92 ± 2.21 、 61.60 ± 3.61 和 41.84 ± 3.74 ,正常对照组和胞二磷胆碱组与缺血对照组比较,平均逃避潜伏期明显缩短 ($P<0.01$ 和 0.05)。

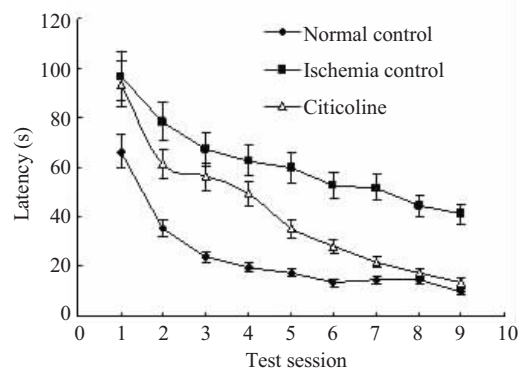


图 1 不同时间段平均逃避潜伏期

Fig.1 Changes of mean escape latency of the rats in various sessions of place navigation test

2.2 胞二磷胆碱对大鼠局部脑缺血后定向航行实验中搜索策略的影响

在定向航行试验中,缺血对照组多采用边缘式和随机式搜索策略;正常对照组多采用直线式和趋向式搜索策略;胞二磷胆碱组采用趋向式和随机式搜索策略的频数较多。统计分析显示,各组之间在趋向式搜索策略频数无明显差异;而直线式和边缘式搜索策略,正常对照组和胞二磷胆碱组与缺血对照组比较有显著性差异 ($P<0.05$,表 1)。

表 1 定向航行实验的搜索策略频数

Tab.1 Mean frequency of probe strategies in place navigation test (n=8, Mean±SD)

Group	Edge	Random	Trend	Line
Normal control	0.88±0.30*	6.88±0.90**	14.00±1.68	14.25±1.76*
Ischemia control	5.75±1.70	11.38±1.56	9.38±1.64	5.50±1.41
Citicoline	4.29±1.02*	10.86±2.66	11.00±1.20	9.85±2.73*

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs ischemia control group

2.3 胞二磷胆碱对大鼠局部脑缺血后空间搜索能力的影响

正常对照组和胞二磷胆碱组在原平台象限停留时间占总游泳时间百分比(分别为 36.27 ± 3.42 和 29.23 ± 3.84) 大于缺血对照组的 22.24 ± 3.46 ($P < 0.01$); 而穿过原平台位置的次数 (11.38 ± 0.93 和 7.86 ± 1.88) 均多于脑缺血对照组 (4.25 ± 0.75) ($P < 0.01$)。

3 讨论

局部脑缺血可以导致大鼠学习和记忆障碍已在实验中得到证实^[2]。为了探讨胞二磷胆碱是否可以改善大鼠局部脑缺血后学习和记忆能力,本研究选用了近年来发展较快、能较好评价实验动物空间学习和记忆能力的 Morris 水迷宫测试系统,与过去的水迷宫及跳台、避暗等检测工具相比,它具有能提供较多的实验参数、系统全面地考察实验动物空间认知加工的过程、客观地反映其认知水平的优点^[3],应用包括单因素重复测量数据在内的统计分析方法,提高了研究结果的科学性和客观性,并对保护机制做了初步探讨。本研究结果显示,局部脑缺血对大鼠造成了明显的空间学习和记忆能力损害。胞二磷胆碱组与脑缺血对照组比较,在每一时间段逃避潜伏期明显缩短,而脑缺血对照组动物在整个训练时间段逃避潜伏期一直处于缓慢下降过程,说明其始终没有完全学会对平台的寻找,学习能力明显下降;胞二磷胆碱明显缩短了大鼠在每一训练时间段潜伏期及全部训练过程的平均潜伏期,证明胞二磷胆碱可以提高局部脑缺血大鼠的空间学习和记忆能力。缺血对照组多采用边缘式和随机式搜索策略,其记忆能力明显下降;胞二磷胆碱组采用趋向式和随机式搜索策略的频数较多,说明胞二磷胆碱可以明显改善脑缺血后大鼠在空间探索试验中的表现,逃避危险的能力有显著提高。胞二磷胆碱组大鼠原平台象限停留时间百分比以及穿过原平台位置的次数均较脑缺血对照组大鼠有明显增加,说明胞二磷胆碱提高了大鼠局部脑缺血后空间搜索能力,大鼠记忆平台位置的能力有显著改善。

胞二磷胆碱是磷酸卵磷脂生物合成的中间产物,对于多种中枢神经系统损伤模型和神经退行性疾病有良好的作用。在脑缺血后胞二磷胆碱增加细胞膜的

稳定性,能使磷脂酶 A2 减少,增加谷光苷肽水平,抑制磷脂水解和花生四烯酸生成,从而限制活性氧簇和脂质过氧化物的产生,限制血脑屏障的通透性,起到神经保护作用^[4,5]。已有实验研究表明胞二磷胆碱能减少半暗带区的细胞凋亡,减小脑梗死体积^[6]。胞二磷胆碱能明显减少局部脑缺血后谷氨酸的生成,进而降低脑缺血后级联反应的损害程度^[7];抑制 MAP 激酶信号通路,说明其在脑缺血后功能恢复中有重要作用^[8]。胞二磷胆碱的神经保护作用,可以增加存活神经元的数量,更好地维持脑功能,我们认为胞二磷胆碱明显改善大鼠局部脑缺血后空间学习和记忆能力的机制可能与其神经保护作用密切相关。

总之,本研究证实,胞二磷胆碱可以明显改善大鼠局部脑缺血后空间学习和记忆能力,其机制可能与胞二磷胆碱对神经元的保护作用有关。

参考文献:

- [1] Wang CX, Yang Y, Yang T, et al. A focal embolic model of cerebral ischemia in rats: introduction and evaluation [J]. Brain Res Protoc, 2001, 7(2): 115-20.
- [2] Yonemori F, Yamaguchi T, Yamada H, et al. Spatial cognitive performance after chronic focal ischemia in rats [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1999, 19(5): 483-94.
- [3] D'Hooge R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory [J]. Brain Res Rev, 2001, 136(1): 60-90.
- [4] Adibhatla RM, Hatcher JF. Citicoline decreases phospholipase A2 stimulation and hydroxyl radical generation in transient cerebral ischemia [J]. J Neurosci Res, 2003, 73(3): 308-15.
- [5] Adibhatla RM, Hatcher JF, Dempsey RJ. Citicoline: neuroprotective mechanisms in cerebral ischemia [J]. J Neurochem, 2002, 80(1): 12-23.
- [6] Sobrado M, Lopez MG, Carceller F, et al. Combined nimodipine and citicoline reduce infarct size, attenuate apoptosis and increase Bcl-2 expression after focal cerebral ischemia [J]. Neuroscience, 2003, 118(1): 107-13.
- [7] Hurtado O, Moro MA, Cardenas A, et al. Neuroprotection afforded by prior citicoline administration in experimental brain ischemia: effects on glutamate transport [J]. Neurobiol Dis, 2005, 18 (2): 336-45.
- [8] Krupinski J, Slevin M, Badimon L. Citicoline inhibits MAP kinase signalling pathways after focal cerebral ischaemia [J]. Neurochem Res, 2005, 30(8): 1067-73.